

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 村西 菜苗

### 論文題目

Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy

### 論文内容の要旨

自発ラマン分光法は対象にレーザー光を照射して得られるごく弱い散乱光（ラマン光）を分析する方法であり、分子構造に基づく定量的な化学的情報を得ることができる。光を照射するだけで分子特異的な情報が得られるため、生物学的な検体に関しても染色などの侵襲的な操作を加えることなく正確な情報を得ることが可能である。近年ラマン分光法を用いた細胞や組織の分子レベルでの解析、医学的診断への応用が進んでいる。

2009年に我々は自発ラマン分光法によって心筋細胞と陳旧性心筋梗塞巣のラマンスペクトルを明らかにし、染色等の侵襲的手法を用いずにそれぞれに特徴的な分子であるチトクロム C と I 型コラーゲンのスペクトルの特徴を利用してイメージングすることに成功した。その際正常組織と完全に線維化をおこした心筋梗塞瘢痕組織を対象にしたが、壊死組織や肉芽組織といった心筋梗塞の治癒過程上の組織は対象にしていなかった。持続する心筋虚血により心筋細胞は壊死に陥り、1-2 日後には炎症細胞が壊死組織周囲に浸潤する。5 日後には血管新生や線維芽細胞の増生が著明となり、肉芽組織が形成される。3-4 週間で梗塞領域でのコラーゲンの増生がすすみ、線維化組織が完成する。心筋梗塞組織をより精緻に評価するため、本研究では、自発ラマン分光法を用いてラット心臓の心筋梗塞治癒過程のラマンスペクトルを明らかにし、それが心筋組織の化学的变化に基づいていることを証明することを目的とした。

実験には Wistar ラットの左冠動脈前下行枝結紮モデルを用いた。正常心臓、冠動脈結紮後 2 日(壊死組織)、結紮後 5 日(肉芽組織)、結紮後 21 日(線維化組織)の心臓を摘出し、Tyrode 液で灌流して血液を抜いた後に凍結切片とし、石英基板上で 532nm YAG レーザー光を照射してラマンスペクトルを測定した。測定した組織は連続切片にてヘマトキシリン・エオジン染色（線維化組織に関してはアザン染色）を行い、測定部分の組織型を確認した。得られたラマンスペクトルから、PLS-DA を用いて各組織のスペクトルの特徴を抽出し、組織の化学的特性を表し

ているかどうか検討した。また、その結果を用いて組織型推定のための多変量モデルを作成し、新たな検体の組織切片上で組織型を正しく推定できるか検討した。

正常組織はスペクトル上  $643\text{cm}^{-1}$ ,  $691\text{cm}^{-1}$ ,  $750\text{cm}^{-1}$ ,  $1130\text{cm}^{-1}$ ,  $1314\text{cm}^{-1}$ ,  $1582\text{cm}^{-1}$  に大きなピークを認めた。特に  $643$ ,  $691$ ,  $1314\text{cm}^{-1}$  のピークは還元型チトクロムに特異的であり、正常心筋のスペクトルに対する還元型チトクロム C の影響は大きいと考えられた。一方、壊死組織のスペクトルでは  $643\text{cm}^{-1}$ ,  $691\text{cm}^{-1}$  にシグナルをもたず、 $750\text{cm}^{-1}$ ,  $1314\text{cm}^{-1}$  のピークも弱まっていることから、還元型チトクロム C の寄与が少なく、正常心筋に存在した還元型チトクロム C が別の形態に変化している可能性が示唆された。そして肉芽組織では前 2 者とスペクトルは大きく異なっており、 $750\text{cm}^{-1}$  のピークは小さく、 $1306\text{cm}^{-1}$  に大きなピークを認めた。 $1306\text{cm}^{-1}$  は文献的にヘモグロビンに特徴的なピークである。肉芽組織では新生血管の増生が盛んであることや、炎症細胞等に貪食されたヘモグロビンが残存している可能性に加え、肉芽組織にて *de novo* にグロビン鎖が合成されているとの報告もあり、それらの理由によって肉芽組織のスペクトルがヘモグロビンの特徴を有しているものと考えられた。線維化組織に関しては前回の報告と同様に I 型コラーゲンの特徴を有していた。これらのスペクトルの特徴を抽出する目的で多変量解析(PLS-DA)を行った。PLS-DA によって計算された特徴スペクトル(LV: Latent variable weight)とその個々のスペクトルへの寄与度を示す負荷量(Score)を分析したところ、チトクロム C、ヘモグロビン、I 型コラーゲンのスペクトルの特徴によって各組織型を高い精度で判別できた。この PLS-DA に基づく特徴スペクトルを用いて作成した多変量モデルにより、結紮後 5 日目の心筋梗塞辺縁部組織において正常組織と心筋梗塞組織を正確にイメージングすることができた。

以前より我々は開心術における術中心筋イメージングにラマン分光法を応用できないかと考え研究を進めてきた。重症の虚血性心筋症に対し心筋梗塞部位を切除し左室形状を整える左室形成術は効果的な治療手段であるが、左室形成術において心筋切除範囲の判断は手術結果を左右する。術中に心筋の *viability* を正確に評価することができればこの判断に際し有用な情報となる可能性がある。まだ様々な課題はあるものの、自発ラマン分光法により正常組織と様々な時相の心筋梗塞組織が明瞭に判別できたことは今後本研究を進めるための基盤になると考えられる。